

⑫ 公表特許公報(A)

平5-506142

⑬ 公表 平成5年(1993)9月16日

⑭ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求  
C 12 P 21/08 8214-4B 予備審査請求 有 部門(区分) 1(1)  
A 61 K 39/395 L 8413-4C  
8931-4B C 12 N 15/00 C※  
(全5頁)

⑮ 発明の名称 HIV蛋白質の非免疫支配エピトープに特異的なモノクローナル抗体

⑯ 特 願 平3-503590

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)7月16日

⑱ 出 願 平3(1991)1月16日

⑲ 国際出願 PCT/US91/00319

⑳ 国際公開番号 WO91/10742

㉑ 国際公開日 平3(1991)7月25日

優先権主張 ㉒ 1990年1月16日 ㉓ 米国(US) ㉔ 465,035

㉕ 発 明 者 ヒギンズ, ポール・ジェイ アメリカ合衆国マサチューセッツ州02153, メドフォード, シエリ  
ダン・アベニュー 8

㉖ 出 願 人 レブリゲン・コーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, ワン・  
ケンドール・スクエア, ビルディング 100

㉗ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外6名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. HIVエンベロープ蛋白質の非免疫支配エピトープを認識することができ、且つ前記エンベロープ蛋白質への結合が HIV感染患者からの血清によって阻止されない抗体。
2. 前記エピトープがグループに共通なものである請求項 1の抗体。
3. HIV エンベロープ蛋白質免疫細胞の表面に結合することが可能な請求項 2の抗体。
4. HIV エンベロープ蛋白質の473 から759 のアミノ酸残基間(両端を含む)の領域を認識する請求項 3の抗体。
5. 前記領域内のgp120 の部分を認識する請求項 4の抗体。
6. ATCC No. H9 10321 の細胞系によって産生される請求項 5の抗体。
7. 更に毒素を結合して含むことにより、ヒトHIV 陽性血清の存在下でもHIV 感染細胞を死滅させ得る結合体を形成した請求項1-6 のいずれか1項の抗体。
8. 前記結合体が、HIV 感染細胞の内部に移行することができる請求項 7の抗体毒素結合体。
9. 更に、毒素結合体を形成するため前記抗体に共有結合した第二の抗体を含む請求項 1-6のいずれか1項の抗体。
10. HIV 感染細胞を死滅せしめるに十分な量で、請求項 6の抗体毒素結合体もしくは請求項 8の抗体毒素結合体を投与することからなる、HIV感染患者の治療方法。

明 示

HIV蛋白質の非免疫支配エピトープに特異的なモノクローナル抗体

発明の背景

本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に特異的な抗体に関する。

HIV は後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因因子であると言われている(Popovic et al., 1984, Science 224:497)。これは、そのゲノムが少なくとも6ヶの遺伝子産物をコードし得るヒトの病原性レトロウイルスである。そのenv遺伝子は、蛋白分解によって、120 kD外層蛋白(gp120)と41 kD 核膜蛋白(gp41)とに処理される160 kD のグリコシル蛋白(gp160)をコードする。gp120 は、非共有結合によってgp41と共に、ビリオンに結合される。gp120 とgp41とは、ビリオン粒子ならびにウイルス感染細胞双方の表面に存在している。

HIV の異なる株は、ウイルスのゲノムによってコードされる蛋白のアミノ酸配列部、それも特に、外層蛋白gp120 のアミノ酸配列順序(Starich, 1986 Cell, 45:537; Baba et al., 1986, Science 232:1548)において変異する。gp120 のポリペプチド配列は、その全長に亘って、ひとつのHIV 変異体から他の変異体へ約20-25%変化する。全エンベロープ蛋白に及ぼす変化的変異は一定していない。保存領域と可変領域にはひとつのパターンがあり、これは蛋白が、別個な機能の履行になっている領域に分割されていることを示唆している。多くの異なる領域については、例えば、CD4 の結合領域、主要な中和決定因子それに細胞毒性のT 細胞認識決定因子が、これまでに確認されている。

他の病原の性質には、これまで既知の細胞に対する抗体が用いられてきた。Zarling 等 (EPO 308 935)は、HIV に感染した細胞を選択的に死滅させるGP120 の主要な中和領域に特異的な抗体の毒素結合体(ヘテロコンジュゲート)を開示している。Pincus等 (J. Immunol., (1989) 142:3070)は、gp120 の免疫支配領域をも認識する抗体毒素結合体について記述しており、Till等 (Proc. Nat. Acad. Sci., 1989, 86:1981)は、抗gp41毒素結合体を開示している。

発明の概要

本発明は、HIV エンベロープ蛋白質の非免疫支配エピトープを認識することが可能な抗体を特色としており、この場合、エンベロープ蛋白への抗体の結合に、HIV

IVに感染した患者の血清によって阻止されない。本明細書中で使用する「抗体」とは、全抗体分子あるいはフラグメントもしくは抗体の糖鎖体指しており、例えば、抗体のフラグメントは、分子のFab<sub>2</sub>フラグメント、Fab<sub>1</sub>フラグメントまたは長鎖もしくは短鎖のみであってよく、例えば糖鎖体は、Busson等がWO 88/09344で、またLadner等がWO 88/01649で記述しているように、長鎖と短鎖の双方を含む鎖状ポリペプチド分子であってもよい。本明細書で使用する「非免疫支配エпитープ」とは、有意に免疫原性でない、つまり、少なくともヒト患者のTSSで、抗体反応を誘引しない天然蛋白の構造内におけるアミノ酸の配列を意味している。本発明によれば、HIV エンベロープ蛋白の非免疫支配領域に向けられた抗体は、構造的に結合する糖鎖抗体が不在であったり、低濃度であるためにその領域に結合することが可能である。対照的に、エンベロープ蛋白の免疫支配領域に向けられた抗体は、患者の、HIV 感染に対する自然な免疫反応により、患者に抗体が存在するため、恒的エンベロープ蛋白への結合から、部分的に、あるいは完全に阻止されることになる。非免疫支配エンベロープ領域は、エンベロープ蛋白の、gp120 もしくはgp41部分内にあると思われる。非免疫支配性は、HIV 陽性ヒト血清の存在下で、恒的抗原に試験管内で抗体を結合させることによって、測定することが可能である。非免疫支配エпитープに特異的な抗体は、HIV 陽性血清の存在下もしくは不在下で、比較可能な結合効率を真正しよう。HIV 陽性血清の存在下における恒的抗原に対する抗体の結合効率は、少なくとも、HIV 陽性血清の不在下におけるその結合効率の80% である。

好ましい態様において、抗体によって認識される非免疫支配エпитープは、グループに共通する。本明細書において使用する「グループに共通する決定因子」とは、その株にのみ特異的でなく、少なくとも、もうひとつのHIV 株上にも存在するHIV 株によってコードされる蛋白の、抗原部分を意味する。好ましくは、抗体は、HIV のエンベロープ糖蛋白を免疫する細胞の表面に結合し得るものであり、Ratner等の1985, Nature 313:277における番号順の申し合わせによる、アミノ酸残基 473から759 まで（両端を含む）におけるエンベロープ蛋白の領域を認識することができ、かつ、473 から759 までのアミノ酸領域内に含まれるgp120 の部分を認識することができるものである。このような抗体の一例に A.T.C.C. No

と反応する抗体結合体を用いて選択的に死滅せしめると、ウイルスの感染サイクルは中断されるであろう。

本発明の抗体または抗体毒素結合体もしくは抗体異種結合体のひとつの利点は、その抗体が特異的であるHIV エンベロープ糖蛋白エпитープの、非免疫支配性である。非免疫支配性の結果、もしくは、ヒトの免疫系がエпитープに対する検出可能な応答を増大し得ないということの結果、そうしたエピトープ、つまりHIV 感染患者におけるエンベロープ蛋白の、gp160 非免疫支配エピトープに対する恒的抗体は、もしあるとしても、極く低かにすぎない。従って、本発明の抗体毒素結合体もしくは抗体異種結合体を用いて、HIV 感染患者を治療した場合、恒的非免疫支配エピトープに対する恒的抗体と結合することなく、HIV 感染細胞を選択的に恒的とすることが可能になる。

本発明による特定の抗体、抗体毒素結合体ならびに抗体異種結合体が有するもうひとつの利点は、HIV エンベロープ糖蛋白の、グループに共通した決定因子を認識し得る能力である。グループに共通した決定因子と云うのは、HIV の異なる株間で、本質的に不変なエンベロープポリペプチド部分である。従って、グループに共通した決定因子を認識し得る抗体は、HIV の、いずれの株のgp160 も認識することも可能である。そうした理由から、本発明に従って行なうHIV 感染患者の治療は、HIV のいずれかひとつの株に限定されないばかりか、その恒的決定因子が共通するすべての株を包含することになる。

本発明の、他の特色や利点は、その好ましい態様に関する下記の説明や請求の範囲から明らかになる。

#### 好ましい態様の説明

最初に、図面について簡単に説明する。

#### 図面

図1は、gp120, gp41, p121 ならびに pENV9領域を示すgp160 蛋白の模式図である。

図2は、ICI 抗体の、恒的抗原に対する結合特異性を試験した ELISA法による結果を示すグラフである。

図3(a)・3(d)は、HIV 陽性血清の存在下で、ICI 抗体もしくは対照抗体につ

いて、その結合特異性を測定した ELISA法の結果を示すグラフである。

他の好ましい態様としては、抗体は毒素に共有結合して結合体を形成するものであり、その結合体が、ヒトHIV+ 血清の存在下で、HIV に感染した細胞を死滅させ得るものである。細胞の殺傷作用は、HIV 感染細胞による抗体毒素結合体の、細胞内への取込みによって生じるであろう。この結合体は、抗体と毒素分子を化学的に結合する蛋白レベルで、またはDNA レベルで上記Bussonの抗体をコードするDNA の配列をクローニングし、毒素をコードするDNA の配列に連結することによって作られる。

本明細書中で使用する用語「毒素」とは、有毒レクチン、リシン、アブリン、モダクシン(modacsin)、ジフテリア毒素、シェードモナス外毒素または好ましくはそのトキシンA部分といった一般に呼称される毒素、並びに放射性同位元素、細胞毒素剤ならびに細胞毒のような他の毒性剤をも含む意味で使用されている。「毒素」は、またひとつの抗体分子に結合し、それによって毒素の細胞毒性を提供し得るさまざまな毒素の組合せを指すこともある。

本発明の、他の、好ましい態様では、HIV 特異抗体は、異種抗体（ヘテロアグリゲート）もしくは異種抗体（ヘテロ抗体）としても知られる、抗体の異種結合体（ヘテロコンジュゲート）を形成させるために、エフェクター細胞に特異的な第二の抗体に連結される。異種結合体の恒HIV 抗体は、HIV 感染細胞つまり、死滅させるべき恒的細胞に結合する一方で、異種結合体の抗エフェクター抗体は、例えば、（T細胞としても知られる）細胞毒性T細胞、単核球（特にマクロファージ）、顆粒球もしくは、ナチュラルキラー作用または抗体依存性細胞傷害作用を伴った細胞を含む大型顆粒リンパ球といった末梢血リンパ球（PBL）の集団内に見られるエフェクター細胞に結合し、結果的に、異種結合体の抗体成分がエフェクターと恒的細胞とを認識し、それによって細胞傷害エフェクター細胞による恒的細胞の死滅を促進する。

HIV に感染した患者は、HIV 感染細胞を死滅せしめるに十分な抗体毒素結合体もしくは本発明の抗体異種結合体の一定量を投与することにより治療することが可能である。ウイルスの活発な産生中、ウイルスのエンベロープ蛋白は、感染細胞の表面に免疫される。ウイルスが増殖している細胞を、ウイルス特異表面抗原

いて、その結合特異性を測定した ELISA法の結果を示すグラフである。

図4(a)・4(d)は、ICI 抗体を用いて行なった FACS 分析の結果を示すグラフである。

次に、本発明による抗体の調製と使用方法とを説明する。

#### 免疫原

本発明による抗体の産生には、gp160 (Regisys Corp., Cambridge, MA) と残基473 から残基 759 に及ぶエンベロープ蛋白フラグメントで、pENV (Ivanoff et al., 米国特許 No. 4,861,707) と命名された2 種類の免疫原を使用した。

gp160 は、標準技法に従って完全フロイドアジュバンド (CFA) (Difco Labs, Grand Island, NY) と乳化して免疫処理のために調製した。

#### モノクローナル抗体の産生

Balb/cJ 系統マウス (Jackson Labs., Bar Harbor, ME) に、一匹当たりgp160/CFA 70μg の腹腔内投与による免疫化を行なった。3 週間後、マウスにフロイドの不完全アジュバンドによる乳化物で、ブースター免疫処理を行なった。マウスを採血し、その血清について、免疫原と反応する抗体の有無を検査した。強力な血清学的反応を示したマウスには、最初のブースター免疫の5 週間後、溶解状態のpENV9 による最終的なブースター免疫処理を行い、3 日後、これらマウスより得た脾臓細胞を、免疫グロブリン長量、短量のいずれをも分泌し得ない SP2/0 (A.T.C.C. No. CRL8287, A.T.C.C. No. CRL8006) の骨髓瘤細胞 (Kearney et al., J. Immunol., 1979, 123:1548) と、5:1 の比率で、Kohlerならびに Milstein (Nature (1975) 256:495) の方法に準拠した標準的な方法により融合した。

融合の10-21 日後に出現したハイブリドーマから得た上清を、pENV9 の蛋白フラグメントと反応する抗体の産生についてスクリーニングにかけた。

96-ウェルの Corning 平底マイクロタイター板のウェルはいずれも、各ウェルでの最終濃度が2-10 μg/ml のpENV9 蛋白フラグメントを含むPBS 溶液50マイクロリットルを加えて濃縮した。pENV9溶液は吸引し、ウェルは洗浄して、PBS + 0.5% BSA と入れ替えたのち2 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルは吸引、洗浄したのち、ハイブリドーマ上清液 50 μl を加えて2 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルをPBS で3 回洗浄したのち、西洋ワサビペ

ルオキシゲンダーゼ (HRP, Boehringer Mannheim, West Germany) を結合したヤギ抗マウス免疫グロブリンの適切な用量 50  $\mu$ l を加えて、1 時間インキュベートした。ウェルは再び、PBS で洗浄し、そして結合抗体検出のため 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 1:1000 希釈液を加えた。0.1M クエン酸ナトリウム pH4.2 中の 1 mM ABTS (2,2'-アジノビス(3-エチルベンズアゾリウム 6-スルホン酸) 100  $\mu$ l を西洋ワサビペルオキシゲンダーゼの基質として加えた。30 分後、Dynatech 分光光度計の自動読みとり器 (Virginia) により OD<sub>450</sub> で吸光度を測定した。

試験の結果最初の免疫抗原 gp160 への結合が陽性だった 4 種類のハイブリドーマ (IC1, 1H9, 2D7 および 2H8) について、第 2 の免疫抗原、pENV9、と他の異なった HIV 株から得た gp160 への、結合能力の有無を試験した。ELISA 法により、pENV9 フラグメントとの反応性を示した IC1 と呼ばれるひとつのハイブリドーマクローンは、1 株以上の HIV 内に存在する、つまり、下記に説明するようなグループに共通した決定因子であるエンベロープ蛋白決定因子をも認識し得る抗体を産生した。

上記 4 種類の抗体は、HIV-1/II 分離株からの gp160 あるいは HIV-2 分離株からの gp160 の、いずれかに結合するかどうかを ELISA 法によって試験した。下記の表 1 に提示した結果は、pENV9 に特異的な IC1 抗体が、IIIB ならびに 89 分離株双方の gp160 と pENV9 とに結合するが、他の 3 種類の抗体が、3 種類の蛋白のいずれをも認識しないことを示している。

表 1

クローン	gp160 <sub>IIIB</sub>	gp160 <sub>89</sub>	pENV9	BSA (コントロール)
IC1	+	+	+	-
1H9	+	-	-	-
2D7	+	+	-	-
2H8	+	+	-	-

り、抗gp160抗体はpENV9 およびp121に結合したがgp120 には結合しなかった。

#### ヒト血清の存在下におけるIC1 抗体の結合

HIV エンベロープ蛋白に特異的で、治療的に有用な外因性の抗体は、結合する補集抗体の存在下で、エンベロープ蛋白を発見するHIV もしくはHIV 感染細胞に結合し得る筈である。

IC1 抗体を、HIV 感染患者から得た血清の存在下で、標的抗原に結合し得るその能力を試験し、gp160 の免疫反応性領域と結合することが知られている対照抗体と比較した。図 3(a) - 3(d) は、マイクロタイターのウェルを、補集抗原で被覆して行なった ELISA 法による結果を示している。その後、IC1 または対照抗体を (1) 非感染 HIV 陽性血清、(2) 非感染 HIV 陽性血清または (3) 0.5% BSA の各 50  $\mu$ l 中に加えた。2 時間後、ウェルを洗浄し、ヒト IgG と交叉反応しなかった二次抗体 (ビッツ抗マウス HRP) を加えた。1 時間後、二次抗体を除去し、ウェルを洗浄したのち ABTS を加え、30 分後に OD<sub>450</sub> を測定した。

図 3(a) では、IC1 抗体が、補集抗原 pENV9 に結合するかどうかを検査している。その結果は、HIV 陽性血清もしくは HIV 陽性血清の存在下で、IC1 がほぼ等しい効率で pENV9 に結合したことを示している (図 3a)。IC1 抗体は、抗体濃度が 0.01  $\mu$ g/ml の HIV 陽性血清の存在下において、最高の効率で pENV9 に結合したが、HIV 陽性血清の存在下での、この抗体の pENV9 への結合は、抗体濃度 1  $\mu$ g/ml および 10  $\mu$ g/ml の HIV 陽性血清の存在下での pENV9 への結合効率と比べると、それぞれほぼ 85% および 95% 以上であった。他の 4 人の患者から得た HIV 陽性血清の存在下で、IC1 の結合を試験した時にも同様な結果が得られている。これらの結果は、HIV 陽性血清中に pENV9 特異抗体が存在しているとしても、その力価は十分に低いか結合親和性が弱く、あるいは異なった pENV9 のエピトープと反応するため、pENV9 への IC1 抗体の結合を有意に干渉しないことを示している。従って、IC1 は、一種の有用な治療剤としての可能性がある。

図 3(b) では、IC1 抗体の p121 蛋白への結合能力を試験しているが、IC1 抗体は全く p121 に結合していない (0.5% BSA 中で 0.1  $\mu$ g/ml 以上の IC1 の濃度で被覆された p121 との最小限の反応性は、非特異的な結合によるものであろう)。

対照抗体、抗gp160 (Eutopic, Inc.) ならびに 2 種類の標的抗原、p121 と pENV9

IC1 クローンのイソタイプは、主要な免疫グロブリンの各イソタイプに対応するヤギ抗マウス HRP (Zymed Labs, San Francisco, CA) 製品を用い、ELISA 法によって IgG<sub>2a</sub> であることを確認した。IC1 クローンは、サブクローニングし、上記抗原への結合能力を再度スクリーニングした。ブリストンによる処理を受けた Balb/c マウスに、IC1 サブクローンを腹腔内注射して増殖させた。腹水をマウスから採取し、抗体は下記のようにしてプロテイン A 親和性クロマトグラフィーによって精製した。

#### モノクローナル抗体の増殖と精製

精製 IC1 抗体は、ブリストン処理した同系マウス (syngeneic mice) に、繰り返し ELISA 法による試験結果が陽性だったハイブリドーマのサブクローンを腹腔内注射して調製した。生じた腹水は、注射の 2-3 週間後に回収し、抗体を下記のごとく精製したのち PBS に対する透析を行なった。

IgG<sub>2a</sub> の IC1 抗体を含む腹水は、0.1 M Tris/3 M NaCl pH8.9 で 5 倍に希釈し、同じ緩衝液と平衡化したプロテイン A-セファロース親和性カラムに結合させたのち、0.15M NaCl、0.1M 酢酸、pH3.0 を用いてカラムから抽出させた。抽出後、抗体は直ちに 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて中和した。

#### IC1 抗体の結合特性

IC1 抗体は、それが結合するエピトープを位置づけるため、ELISA 法により pENV9gp120 ならびに p121 との結合の有無を試験した。p121 (Chang et al., 米国特許 No. 4,774,175) は、gp160 の gp41 部分内で、アミノ酸 566-608 にまたがる B3 アミノ酸蛋白フラグメントであり、完全に、pENV9 の配列内に含まれている (gp160 のこれら領域は、図 1 に模式的に説明されている)。p121 は、gp41 蛋白の主要な免疫反応エピトープを包含している (Chang et al., 米国特許 No. 4,774,175 ならびに Wang et al., 1986, Proc. Nat. Aca. Sci. 83:16159)。図 2 は、ELISA 法による測定結果を示している。これらの結果は、IC1 が pENV9 と gp120 とに特異的に結合するが、p121 には結合しないことを示している。従って、IC1 抗体は、gp120 内にも存在する pENV9 の領域に結合するが、それは p121 部分内に含まれていない。対照実験では、gp41 に特異的な抗体 (Eutopic, Inc., Beaverton, OR) が、pENV9、p121 または gp120 に結合するかどうかを試験したところ、予想通

とを用いて 2 種類の追加対照実験を行なった。図 3(c) および 3(d) に示した結果は、抗gp160 標的抗原のいずれにも結合するが、抗体濃度が 0.1  $\mu$ g/ml の場合、pENV9 への結合より、p121 への結合がより効率的であることを示している。この結果はまた、これらの同じ抗体濃度では、抗gp160 抗体の結合が HIV 陽性血清によって部分的に阻止されている。これらの結果は、抗gp160 抗体の結合を部分的に阻止することが可能な p121 および pENV9 に特異的な抗体が、HIV 陽性血清中に存在することを示している。

#### 細胞への IC1 抗体の結合

HIV エンベロープ蛋白を発見する細胞の表面に、IC1 モノクローナル抗体が結合するかどうかを、間接免疫蛍光法と FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter, Methods in Enzymology, 1984, Parks et al., 108:197) による分析とにより下記のごとく検証した。

IC1 抗体は、その表面に gp120 と gp41 の両方を発見する HIV<sub>env</sub> 遺伝子を含むワクチニアウイルス組換え体により感染した CV1 細胞 (A.T.C.C. No. CCL70) (CV1-Env) もしくは陰性対照として、HIV<sub>env</sub> 遺伝子を持たないワクチニアウイルス組換え体によって感染した CV1 細胞 (CV1-Lac) のいずれにも結合した。HIV エンベロープ遺伝子全長を発見することが可能な組換え体の構造については、参照文献としてここに含まれる EP0 243 029 に記載されている。図 4(a)-(d) に結果を示す。

図 4(a) では、IC1 抗体は CV1-Env 細胞に結合したが、図 4(b) を IC1 抗体とインキュベートされた CV1-Lac 細胞に対する FACS のプロフィールを示す図 4(b) に重ね合わせると、CV1-Lac 細胞と比較して、CV1-Env 細胞においては蛍光強度に右寄りの移動 (つまり、増大) があり、このことは IC1 抗体が、エンベロープ蛋白を発見しない細胞よりも、HIV エンベロープ蛋白を発見する細胞に有意に良好に結合することを意味している。このような結果は、IC1 が自然状態の標的抗原に結合することを示し、かつ、HIV エンベロープ蛋白を発見する細胞が、毒素に感染した IC1 からなる免疫毒素結合体に対する特異的である可能性を示唆するところから重要である。図 4(c) と図 4(d) とは、それぞれ IC1 抗体を感染していない CV1 細胞に結合させ、緩衝液のみを IC1-Env 細胞に結合させた対照であ

る。(CVI-Envおよび CVI-Lac)細胞の FACS 分析の明らかな背景の脱光は、恐らく異種ウイルス蛋白の発現によって生じた細胞膜の変化によるものであろう)。

#### 異種結合体の抗体結合体形態

抗体は、例えば、Viellet et al., 1987, Science 238:1038に記載されているように細胞毒性剤に結合して免疫毒素として用い、あるいは抗-HIV薬剤もしくは毒素を含むリボソームの表面に付加して、こうした薬剤や毒素をHIV 感染細胞に対して特異的に集中させることができる。本明細書に使用した免疫毒素と云う用語は、抗体と一緒に置もしくはそれ以上の毒素との結合体を意味している。様々な毒素を抗体分子に結合させた場合、異なった化学的順序によって、例えば、共有結合、配位結合、挿入(インターカレーション)、配位結合および糖形成といった結合が利用できる。しかしながら、抗体と毒素との好ましい結合は、化学的なあるいは遺伝子融合による共有結合である。

好ましい態様では、免疫毒素は、結菌菌(Pseudomonas aeruginosa)の外毒素に連結したHIV エンベロープ蛋白の、非免疫支配性グループ共通エпитープに反応する抗体である。結菌菌の外毒素(PE)は、容易に大量調製でき、ヒトがそれに対する中和抗体を通常持っていないこと、および結合に先立ってサブユニットに分離する必要があることなどの理由で他の毒素に比べて特に好ましい。PEは結菌菌によって分泌され、真核細胞内での蛋白合成を抑制する極めて毒性な単量体蛋白(分子量66 kD)である。PEの好ましい形態は、細胞への結合領域が除去されたPE 40と呼ばれる切断分子(Pastan et al., EP 出願公開 No. 0 261 671)である。PE40は、例えば、ヘテロ二官能性架橋リンカー-SPDP (N-スクジニミジル-3-(2-ピリジルジナール) プロピオンート), Sigma, St. Louis, Mo)(Pastan et al., 1986, Cell 47:641)を用いたり、遺伝子融合(Chaudhary et al., 1989, Nature 339:394)によって、本発明の抗体に、化学的な結合により連結することが可能である。抗体の異種結合が好ましい場合は、抗体結合に適切な任意の方法が使用でき、例えば好ましい方法には、Karpovsky et al.(1984, J. Exp. Med. 160:1686)の方法による架橋リンカー-SPDPを用いて、抗体を架橋連結する方法がある。架橋連結に引き続いて、異種結合体はサイズ排除クロマトグラフィーによって遊離抗体から分離される。

、細胞内もしくはリンパ系内を含む、常用の方法で投与されるが、それらの方に限定されない。更に、本発明の抗体、免疫毒素または異種結合体は、治療の効果を高めるために他の治療と関連して投与することもある。

#### 他の態様

他の態様は、下記の請求範囲内にある。例えば、ほとんどの場合、モノクローナル抗体は、ヒト以外の種から産生されているため、ヒトに対してはしばしば免疫原性である。これらのモノクローナル抗体を、ヒトの治療に有効に使用するためには、リガンドとの結合に関連するポリペプチドの部分(可変領域)が、ひとつの種に由来し、構造的な安定性や他の生物学的機能の提供に関与する部分(不変領域)がヒト抗体に由来するキメラ抗体分子を創造する必要がある。本書に参照して含まれる Neuberger等(WO 国際公開 No. 86/01533)ならびに Morrison 等(EP 出願公開 No. 0173494)は、可変領域がひとつの宿主に由来し、不変領域が第二の宿主に由来するキメラ抗体産生の方法を提示している。

別法として、可変領域の相補性決定領域(CDRs)のみを、所望する抗原特異性の免疫グロブリンからのCDRsと置換することによって、抗体を産生する方法は、Winter (GB 出願公開 No. 2 188 638)に記載されている。例えば、グループ共通決定因子と非免疫支配性領域とを認識するpENV9 に特異なマウスのモノクローナル抗体のCDRsは、組み換えDNA 技法によってヒト抗体のフレームワークに移植することが可能である。こうした態様は、モノクローナル抗体を治療に応用する場合、特に有利である。

#### 委託

細胞系 IC1-185は、1990年1月10日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに委託され、委託番号88 1032144で与えられた。出願者の譲受人である Ecoligen Corporation は、A.T.C.C.が委託の永続性を提供する保管者であり、特許が認可された場合、公衆による入手が可能であることを保証する。かくのごとく委託された物質の、公衆による入手上の制約はいずれも、特許が認可された時点で除去され、その施設は不可能となるものとする。当該物質の入手は、ATCC, R. 1.15 および35 U.S.C.122のもとに米国特許庁長官がその資格を有すると認定した個人に対して、本特許出願の保護中可能となる。委託された物質は、その寄

本発明の抗体毒素結合体または異種結合体は、該結合体をHIV エンベロープ蛋白を発現するHIV に慢性感染した細胞または非感染細胞と共にインキュベートし、該細胞を<sup>3</sup>H-チミジンまたは<sup>14</sup>C-ロイシンで短時間標識することによって、標的特異性や死滅効率を確認し得る。毒性は、非感染対照細胞と対出した感染細胞における細胞分裂もしくは蛋白合成の低下によって測定できる。細胞の死滅効率は、感染細胞を本発明の結合体と共にインキュベートし、限界希釈して平板に定着し、生存細胞数を両側に処理した非感染細胞と比較するクローン性検査法(cloacogenic assay)を用いて算出することが可能である(Farwell, 1981, J. Immunol. 126, 1614)。

#### 用途

免疫毒素として、本発明の抗体を用いる典型的な治療では、HIV 感染細胞のみで発現される蛋白に結合する抗体を、HIV 感染細胞に(および非感染細胞にも同様に)毒性である毒素(例えば、シュドモナス外毒素)に結合させる。抗体に細胞傷害剤を結合することにより、非特異的な毒性レベルを顕著に低めて標的細胞に対し特異的に作用する高度な毒性効果を得ることが可能である。毒性剤は、その結合する抗体が、標的(この場合は、HIV 感染細胞)に対して特異的に薬剤を選び、それによって非感染細胞を毒素から遠ざけるから、その使用が可能である。細胞傷害剤に抗体を結合させるために使用できる技法は、上記Viellet et al. および 1988 年8月24日に公開されたヨーロッパ特許出願 No. 279,688に、詳細に記述されている。

本発明の抗体は、HIV に感染した個人の治療用途への使用のため、常用の製薬処方に取り入れることが可能である。更に、こうした処方では、製剤に受け入れ得る塩類、希釈剤、塩およびこの科学の分野でよく知られた他の様々な物質を含むことができる。等張食塩水、滅菌水、10% マルトース、ヒト血清アルブミン、グリシンまたは他の製薬的に受け入れ得る物質が、本発明の抗体から成る製薬処方の組成上、希釈液、塩類もしくは緩衝液として使用できる。

製剤組成物は、固形、半固形、液体、粉末、ビル、錠剤、液剤もしくは懸濁液、坐剤、ポリマーマイクロカプセル、リボソームまたは注射もしくは注入可能な形態といった様々な形態からなることができる。製薬処方では、静注、経口、皮下

死滅生物のサンプル提供に関する最も最近の要請後、少なくとも5年間は、その生存を可能にし、かつ汚染させないため入念に必要なあらゆる処置を講じて保管し、またいかなる場合においても、委託日後少なくとも30年間、あるいは特許権の有効期間のいずれか長い期間に保管されるものとする。出願人の譲受人は、万一、委託物質の状態により、要請があった時点で委託機関がサンプルを提供し得ない場合、委託物質を置き換える義務を認めるものである。A.T.C.C.のブタペスト条約による委託証明書の手しは、要請ある場合提出されるものとする。

要約書

グループに共通する決定因子ならびにHIV エンベロープ蛋白の非免疫反応エピトープを認識し得る抗体あって、エンベロープ蛋白への抗体の結合が、HIV 感染患者の血清によって阻止されない抗体。

国際調査報告

CLASSIFICATION NO. SUBJECT MATTER is given (checked only) (checked only) (checked only)		PCT/US91/00319	
IPC(5): G12P 21/00; C07K 15/28; B61L 39/00			
U.S. Cl.: 530/387.389; 424/85.91.00			
FIELD OF SEARCH			
Examination Report		Examination Report	
U.S.		530/387.389; 424/85.91.00	
Description of the invention is given (checked only) (checked only) (checked only)			
B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:			
Country	Character of Document	Relevant Information	Relevant Information
Y	US.A. 4,340,535 (UNSTEIN ET AL) 20 JULY 1982. see abstract.		6-10
Y	Gene. Volume 52, issued 1987. A. BRINTVASSAN ET AL. "Molecular characterization of human immunodeficiency virus from Zaire: nucleotide sequence analysis identifies conserved and variable domains in the envelope gene". pages 71-82. see page 78. figure 5 and page 80.		1-10
Y	Cell. Volume 46, issued 1986. J.M. COFFIN. "Genetic Variation in AIDS viruses". pages 1-4. see paragraph bridging pages 1 and page 2. and page 3.		1-10
<p>1. "Relevant Information" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>2. "Character of Document" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>3. "Relevant Information" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>4. "Character of Document" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>5. "Relevant Information" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>6. "Character of Document" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>7. "Relevant Information" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>8. "Character of Document" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>9. "Relevant Information" (checked only) (checked only) (checked only)</p> <p>10. "Character of Document" (checked only) (checked only) (checked only)</p>			
IV. CERTIFICATION			
Date of the Search (checked only) (checked only) (checked only)			
11 April 1991			
24 MAY 1991			
354/111			
CHRISTIAN H. RUCKEN			

第1頁の続き

⑥Int. Cl. 1

A 61 K 39/395

// C 07 K 15/28  
C 12 N 15/06  
(C 12 P 21/08  
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

ADY S  
D  
C 8413-4C  
8413-4C  
8413-4C  
7731-4H

⑦発明者 スコット, チャールズ・エフ,  
ジュニア

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, ゲインズバ  
ーロー・ストリート 95, アpartment 406